مجله علوم پزشکی رازی دوره ۲۸، شماره ۱، فروردین ۱۴۰۰ http://rjms.iums.ac.ir

مقاله پژوهشی

تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد تالاسمی ماژور توسط شناسایی موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین

ماندانا زعفری: استادیار، گروه مامایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساری، ساری، ایران (* نویسنده مسئول) mandana.zafari1762@gmail.com

پوریا گیل: استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

مهرنوش کوثریان: استاد، گروه اطفال، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

محمدطاها سعادتی راد: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ساری، ساری، ایران

چکیده

زمینه و هدف: تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی بیماری تالاسمی با بررسی DNA جنینی شناور در خون مادر قابل اجرا می‌باشد. هدف از این مطالعه تعیین حساسیت و اختصاصیت این روش در شناسایی جهش پدری به ارث رسیده IVS II-I (G-A) با بررسی خون مادر می‌باشد.

روش کار: ۵۰ خانم باردار که در معرض خطر داشتن کودک تالاسمی ماژور بودند وارد مطالعه شدند. خانم‌های باردار با سن حاملگی ۱۴-۱۱ هفته که برای انجام روش‌های روتین قبل از تولد به مرکز بهداشت شهرستان ساری و امیر کلای بابل در سال ۹۳ مراجعه می‌کردند. معیارهای ورود به این مطالعه، زوجین مینور حامل موتاسیون‌های متفاوت، طوری که پدر حامل موتاسیون IVS II-I (G-A) و مادر حامل موتاسیون غیر از آن بود. از هر خانم بارداری که معیار ورود به مطالعه را داشت ۱۰ سی سی نمونه خون محیطی گرفته می‌شد و در لوله‌های حاوی EDTA تخلیه و پلاسما در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. سپس پرایمر و پروب متناسب با جهش مورد نظر طراحی شد. برای شناسایی جهش پدری از تکنیک تک من ریل تایم PCR استفاده شد و نتایج آن با روش نمونه‌گیری از پرز کوریونی مقایسه شد.

یافته‌ها: حساسیت و اختصاصیت روش تخیص غیرتهاجمی قبل از تولد ۷۱/۴۳٪ و ۶۶/۶۷٪ بود و ارزش اخباری مثبت و منفی ۸۳/۴٪ و ۶۶/۶۷٪ بود.

نتیجه‌گیری: با روش تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد می‌توان جهش پدری به ارث رسیده به جنین را شناسایی کرد.

کلیدواژه‌ها

تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد،

تالاسمی ماژور،

جهش IVS II-I

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۹/۱۱

تاریخ چاپ: ۱۴۰۰/۰۱/۲۵

تعارض منافع: گزارش نشده است.

منبع حمایت کننده: حامی مالی نداشته است.

شیوه استناد به این مقاله:

Zafari M, Gill P, Kowsaryan M, Saadati Rad MT. Non invasive prenatal diagnosis of β-Thalassemia by detection of paternally inherited mutation. Razi J Med Sci. 2021;28(1):121-130.

*انتشار این مقاله به‌صورت دسترسی آزاد مطابق با CC BY-NC-SA 3.0 صورت گرفته است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

Razi Journal of Medical Sciences. 2021;28(1):121-130. http://rjms.iums.ac.ir

Original Article

Non invasive prenatal diagnosis of β-Thalassemia by detection paternally inherited mutation

Mandana Zafari: Assistant Professor, Department of Midwifery, Islamic Azad University, Sari, Iran (* Corresponding author) mandana.zafari1762@gmail.com
Pooria Gil: Assistant Professor, Department of Nanobiothechnology, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Mehrnoosh Kosarian: Professor, Department of Pdiatric, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
Mohammad Taha Saadati Rad: Young Researchers Club, Islamic Azad University, Sari, Iran

Abstract

Background and Aims: Prenatal diagnose (PND) in carrier β-Thalassemia couples is very important. PND of Thalassemia, is a part of national prevention program. In all over the world, conventional prenatal diagnosis of Thalassemia is CVS or AC. These methods are invasive, we want to experience the new NIPD for β-Thalassemia with this hypothesis that 50% of invasive PND removed.
Non invasive prenatal diagnose of Thalassemia is possible via detection of paternally mutation in maternal plasma. The history of fetal DNA (fDNA) in maternal circulation dates back to the 1948 by Mandel and Metais. The discovery of fDNA in maternal plasma and serum has opened up new opportunities in non invasive prenatal diagnosis (NIPD). This method has been shown to be potentially useful for prenatal diagnosis of certain neurological disorders, fetal sex determination, sex – linked disease, RhD genotyping, and aneuploidies. Fetal DNA originated from trophoblast cells in the placenta, and it detectable very soon during pregnancy, it only comprised about 3 to 6% (although up to 10% has been reported). Fetal DNA fragments are small in size (< 313 bp). It present during pregnancy until birth. They are rapidly cleared within 2 hours after delivery.
Taq- Man is one of the first methods introduced for Real-time sequence detection. A Taq-Man reaction involves 2 specific primers and probes. Each probe is complimentary to one of the alleles of a mutation and each of them is labeled with a different fluorophore. This method exploits the 5' endonucleolytic activity of Taq DNA polymerase to slice an oligonucleotide probe through PCR amplification thus generating a detectable signal.The aim of this study was non invasive prenatal diagnosis of β-Thalassemia and determination the sensitivity and specificity of this technique for detection paternally inherited IVS II-I (G□A) mutation in fetus.
Methods: Subjects were selected following ethical approval of study protocol from the ethical committee of Mazandaran University of Medical Science, Iran. The sample size of this study calculated according the related studies . Fifty Iranian pregnant women enrolled in this study, they were at risk of having fetuses with β-Thalassemia major. They attended in prenatal diagnosis of Thalassemia center (at 11-14 weeks of pregnancy, before performance of CVS), between May 2014 and Feb 2015, in Sari, Iran. All women assigned informed consent form. We focused exclusively on couples in which the father was carrier for IVS II-I G→A mutation and the mother had been genotyped to carry another β-globin gene mutation, (Of

Keywords
Non invasive prenatal diagnosis,
β Thalassemia major,
IVS II-I,

Received: 01/12/2020
Published: 14/04/2021

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

course, the mutation in each subject had been determined previously by conventional PCR and ARMS method, and followed by agarose gel electrophoresis). Also, 10 milliliters of maternal blood from each pregnant woman were collected into EDTA-containing tube. Maternal plasma was separated from cells by high –speed centrifugation (1900 g or 3000 rpm), and it stored at – 80 0 c until analysis. We were masked as to the identity the samples with numerical coding system, so, these were examined in a blinded manner. We designed two specific primers for IVSII-1(G→A) mutation (Accession No.141900) (www.hgvs.org), on the HBB DNA sequences (NCBI Reference Sequence: NG_000007.3 3 (Homo sapiens beta globin region (HBB)), the oligonucleotid primers of this study were; forward primer: 5'TCACCTGGACAACCTCAAG3', and reverse primer: 5'CCCATTCTAAACTGTACCC3'. The primers pair was optimized to particularly amplify a 200-bp segment of exon 2 of the human β-globin gene. Of course we consider the locus of maternal mutation in β-globin gene that doesn't interfere to our PCR product. Also, for design the Taq-Man probes, we refer in Taq- Man design site (primer digital.com/fast PCR/m15.html FAST PCR manual). The characterics of probes were; GC content 45-65%, no dimer with primer, high Tm 60-65 oc, probe length 18-30 bp, and Tm of primer was 8-10 oc higher than Tm primer. Also, the kind of quencher and reporter were matched with kind of quencher and reporter in the kit. Probe for wild allele was; FAM-AGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGG-BHQ1, and the Probe for mutant allele was; VIC-AGAACTTCAGGATGAGTCTATGGG-BHQ1. Circulatory DNA was extracted from 200 µl of peripheral blood plasma with QIAamp DNA mini and blood kit according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted in a final volume of 200 µl AE buffer and stored at -20 0 c until used for additional analyzing. Also, the genomic DNA concentration was measured by NanoDrope system and electrophoresis. For detection of paternally inherited mutation Taq-Man Real time PCR was used and the result of Taq- man method compared with result of chorionic vilus sampling method (CVS) as a gold standard.

Results: The clinical performance of Taq-Man test was assayed by comparing with routine test. Included in this study were 50 pregnant mothers. In Taq-Man method 38 samples cited in scatter analysis graph as a negative control, because the concentration of DNA was very low and this method didn't have enough sensitivity and specificity for detection, so, the final analysis for assessment of this method was done on 12 samples. We reported 5 cases true positive, 4 cases true negative, 2 cases false negative and 1 cases false positive. Also the sensitivity of Taq-Man was 71.43% with CI95% (60%-83.43%), and specificity 66.67% with CI 95% (54.67%-78.67%). LR+ and LR- were 2.15 and 0.5 respectively. Also NPV and PPN of Taq-Man test were 66.67%, 83.4% respectively.

Conclusion: Non invasive prenatal diagnose can be detect paternally inherited mutation of thalassemia.

Conflicts of interest: None
Funding: None

Cite this article as:

Zafari M, Gill P, Kowsaryan M, Saadati Rad MT. Non invasive prenatal diagnosis of β-Thalassemia by detection of paternally inherited mutation. Razi J Med Sci. 2021;28(1):121-130.

*This work is published under CC BY-NC-SA 3.0 licence.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

مقدمه

بتا تالاسمی از شایع‌ترین کم‌خونی مادرزادی در جهان است که به دنبال جهش‌های متنوع در ژن بتا گلوبین، کاهش سنتز این زنجیره رخ می‌دهد (۱، ۲). حدود ۳٪ از جمعیت جهان (۱۵۰ میلیون نفر) حامل جهش بتا تالاسمی هستند و در صورت ازدواج زوجین مینورها، ۲۵٪ احتمال تولد کودک مبتلا به بتا تالاسمی ماژور در هر بارداری وجود دارد. کودک مبتلا، نیازمند تزریق خون و دفع‌کننده‌های آهن در تمام طول عمر خود است که همه این‌ها عوارض زیادی را به وی تحمیل کند (۲). به همین منظور بحث تشخیص قبل از تولد بیماری تالاسمی در زوجین مینور از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است و در بسیاری از کشورها، تشخیص قبل از تولد تالاسمی جزئی از برنامه‌ی ملی پیشگیری محسوب می‌شود.

در سرتاسر دنیا نمونه‌گیری از پرزهای کوریونی (Chorionic villus sampling -CVS) و امنیوسنتزیس جز روش‌های روتین تشخیص قبل از تولد هستند. البته روش‌های فعلی، تهاجمی، پر عارضه، پرهزینه بوده و با عوارضی چون لکه بینی و سقط همراه هستند (۵-۳). اولین بار مندل در سال ۱۹۴۸ حضور DNA جنینی شناور در خون مادر را مطرح نمود (۳) که این نظریه امکان انجام تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد را پایه‌ریزی کرد. در حال حاضر از این روش برای تشخیص جنسیت جنین، بیماری‌های ژنتیکی وابسته به جنس و تعیین Rh جنین استفاده می‌شود (۴). DNA جنینی شناور در خون مادر از سلول‌های تروفوبلاست جفت منشأ می‌گیرد که از هفته ۵ حاملگی در خون مادر قابل یافت می‌باشد. البته میزان آن ۶-۳٪ از DNA مادر می‌باشد (البته برخی مطالعات تا ۱۰٪ هم گزارش کرده‌اند) که با بالا رفتن سن حاملگی غلظت آن در خون مادر نیز افزایش می‌یابد و طی ۲ ساعت بعد از زایمان از خون مادر پاک می‌شود (۵، ۶).

با توجه به ظهور DNA جنین در خون مادر تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی بیماری تالاسمی اهمیت پیدا می‌کند (۷). اخیراً محققین توجه زیادی به تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد بیماری تالاسمی، با شناسایی موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین با کمک روش‌هایی چون: Mass Array, Real time PCR, nested PCR, cold PCR, digital PCR, and sequencing نموده‌اند. روش Taq- Manیکی از اولین تکنیک‌های معرفی شده در Real Time PCR بود. در این روش از یک جفت پرایمر و پروب ویژه استفاده می‌شود که هر پروب طوری طراحی می‌شود که مکمل هر یک از آلل‌های مدنظر باشد و هریک از پروب ها توسط فلورسنت متفاوت نشان‌دار خواهند شد. در روش Taq Man آنزیم Taq DNA polymerase با فعالیت ۵' اندونوکلئازی خود در حین PCR، به محض برخورد پروبی که بر روی زنجیره DNA مکمل خود نشسته است، آن را خرد کرده و منجر به نشت نور فلورسنت می‌شود (۸). محققینی که در رابطه با تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد بیماری تالاسمی مطالعه کردند به این نتیجه رسیدند که اگر موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین در خون مادر باردار شناسایی شد، انجام روش‌های روتین و تهاجمی فعلی لازم است و در غیر این صورت انجام روش‌های روتین ضروری نیست، چرا که جنین آلل نرمال پدری را به ارث برده است. البته این مطالعات بیانگر حساسیت و اختصاصیت بالای این تکنیک بودند (۹). البته چالش مهم و حل‌نشده‌ی این روش عدم توانایی در تفکیک DNA مادر از جنین می‌باشد (۵).

در مطالعه‌ی مشابهی که توسط چیو و همکاران انجام شد میزان حساسیت و اختصاصت تکنیک Taq man real time PCR را ۱۰۰٪ گزارش کردند (۱۰). البته مطالعات مشابهی نیز با تکنیک nsted real time PCR نیز حساسیت و اختصاصیت تکنیک را ۱۰۰٪ اعلام کردند (۱۱). همچنین آر و همکاران نیز حساسیت ۱۰۰٪ و اختصاصیت ۹۳/۸٪ را در تکنیک Allele specific PCR گزارش کردند (۱۲). در تمام این مطالعات مشابه، هیچیک موتاسیون IVS II- I (G-A) پدری به ارث رسیده به جنین را مورد بررسی قرار نداد و با توجه به اینکه این موتاسیون به‌عنوان شایع‌ترین موتاسیون شمال کشور است این مطالعه با هدف شناسایی موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین (IVS II-I) در تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد و با امید به حذف ۵۰٪ از انجام روش‌های روتین و پیشگیری از تحمیل عوارض نا خواسته به مادر و جنین و به‌عنوان اولین مطالعه در ایران طراحی شده است.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

روش کار

مواد و وسایل مورد استفاده در این مطالعه شامل: کیت استخراج DNA از نوع QIAamp DNA mini and blood kit (USA; www. QIAGEN.com-) (۱۳)، کیت Taq Man از نوع Qiagen Company (USA; www.Qiagen.com) و پرایمر و پروب مخصوص موتاسیون IVS II- I از شرکت (Bioneer Corporation, Korea).

بعد از تایید طرح تحقیقاتی در معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مازندران (ir.mazums.rec.1393.926)، ۵۰ خانم باردار که در معرض خطر داشتن کودک بتا تالاسمی ماژور بودند، وارد مطالعه شدند. حجم نمونه در این مطالعه بر اساس مطالعات مشابه تعیین شد (۲، ۱۱، ۱۲، ۱۴-۱۷). خانم‌های باردار با سن حاملگی ۱۴-۱۱ هفته که برای انجام روش‌های روتین قبل از تولد به مرکز بهداشت شهرستان ساری و امیر کلای بابل مراجعه می‌کردند، بعد از پر کردن فرم رضایت آگاهانه، برای نمونه‌گیری انتخاب می‌شدند. معیارهای ورود به این مطالعه، زوجین مینور حامل موتاسیون‌های متفاوت، طوری که پدر حامل موتاسیون IVS II-I (G-A) و مادر حامل موتاسیون غیر از آن بود. البته موتاسیون آن‌ها قبلاً توسط PCR معمولی یا روش ARMS و الکتروفورز تعیین شده بود. از هر خانم بارداری که معیار ورود به مطالعه را داشت ۱۰ سی سی نمونه خون محیطی گرفته می‌شد و در لوله‌های حاوی EDTA تخلیه می‌شد و بلافاصله پلاسمای آن با سانتریفوژ با سرعت 1900 g or 3000 rpm تهیه و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌شد. همچنین تمام نمونه‌های پلاسما به‌منظور کورسازی کدگذاری می‌شد.

اولیگومر و توالی DNA یک جفت پرایمر برای موتاسیون IVS II I (G-A) با (Accession No.141900) (www.hgvs.org), on the HBB DNA sequences (NCBI Reference Sequence: NG_000007.3 3 (Homo sapiens beta globin region (HBB)) طراحی شد. پرایمر forward و پرایمر reverse طبق جدول ۱ طراحی شد. پرایمرهای مورد نظر برای محصول PCR با طول bp ۲۰۰ طراحی شده بودند. البته موتاسیون‌های مادر نیز مورد توجه و بررسی قرار گرفت تا این موتاسیون‌ها در محدوده‌ی محصول PCR قرار نگیرند. طراحی پروب‌های مورد استفاده در مطالعه‌ی حاضر بر اساس دستورالعمل سایت طراحی پروب انجام شد (primer digital.com/fast PCR/m15.html FAST PCR manual) مشخصات پروب طراحی شده شامل: GC حدود ۶۵-۴۵٪، عدم تشکیل دایمر پرایمر، دمای ذوب ۶۵-۶۰ درجه سانتی‌گراد، طول پروب ۳۰-۱۸bp، دمای ذوب پروب ۱۰-۸ درجه سانتی‌گراد بالاتر از پرایمر؛ و نوع quencher و reporter کاملاً هماهنگ با نوع quencher و reporter کیت در نظر گرفته شده بود. پروب طراحی شده برای آلل نرمال و موتانت در جدول ۱ نشان داده شده است.

استخراج DNA از ۲۰۰ میکرولیتر پلاسما و بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.DNA استخراج شده در ۲۰۰ میکرولیتر از بافر AE رقیق شد و غلظت آن توسط دستگاه نانودراپ و الکتروفورز سنجیده شد. سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آنالیز نگهداری شد. تک من ریل تایم PCR: در واکنش PCR با روش تک من، پروب ها طوری طراحی شدند که اگر نمونه مورد نظر DNA نرمال بود پروب نرمال روی توالی مورد نظر می‌نشست و زمانی که DNA پلی‌مراز شروع به فعالیت می‌کرد و به پروب برخورد می‌کرد با خاصیت اگزونوکلئازی خود باعث خرد شدن پروب نشسته شده بر روی توالی مکمل و نشت نور فلورسنت

جدول ۱- توالی پرایمر و پروب طراحی شده در مطالعه حاضر

توالی پرایمر Forward	5'TCACCTGGACAACCTCAAG3'
توالی پرایمر Reverse	'5'CCCATTCTAAACTGTACCC3
پروب الل نرمال	FAM-AGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGG-BHQ1
پروب الل موتانت	VIC-AGAACTTCAGGATGAGTCTATGGG-BHQ1
طول محصول	۲۰۰bp

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

مربوط به آلل نرمال می‌شد. همچنین در پروب طراحی شده برای آلل موتانت (۸). مراحل PCR شامل: (۱) دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای باز شدن دو زنجیره‌ی DNA(۲) فاز anealin, extention به مدت ۳۰ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تا ۴۵ سیکل (۱۸). همچنین از نمونه کنترل مثبت (نمونه DNAهموزیگوت و هتروزیگوت از موتاسیون IVS II-I) و منفی (DNA نرمال) نیز استفاده شد.

به‌منظور تعیین حساسیت روش تک من ریل تایم PCR، ابتدا ۳ نمونه هتروزیگوت، هوموزیگوت و نرمال برای موتاسیون IVS II-I (G-A) تهیه شد. طوری که غلظت DNA نرمال ۱۲/۲۴ میکروگرم بر میکرولیتر، هتروزیگوت ۱۲/۶۴ میکروگرم بر میکرولیتر، هوموزیگوت ۱۲/۲ میکروگرم بر میکرولیتر بود. همچنین PCR این نمونه‌ها توسط ژل الکتروفورز بررسی شده بود.

به‌منظور تعیین حساسیت یا LOD(limit of detection) تکنیک تکمن ریل تایم PCR، غلظت‌های متفاوتی از DNA شامل DNA هتروزیگوت و DNA نرمال (10^{-1}، 10^{-2}، 10^{-3}، 10^{-4}) تهیه شد؛ یعنی DNA نرمال به‌عنوان DNA مادری و DNA هتروزیگوت به‌عنوان DNA جنینی در نظر گرفته شد. ۵۰ نمونه توسط تکنیک تک من ریل تایم PCR آنالیز شد. با مقایسه‌ی نتایج روش تشخیص قبل از تولد روتین (Reverse dot blot) و روش تک من ریل تایم PCR مثبت حقیقی، مثبت کاذب، منفی حقیقی و منفی کاذب محاسبه شد. مثبت حقیقی: اگر روش روتین نشان دهد که جنین حامل موتاسیون IVS II-I است و روش تک من نیز آن را تایید کند، منفی حقیقی: اگر روش روتین نشان دهد که جنین حامل موتاسیون IVS II-I نیست و روش تک من نیز آن را تایید کند، منفی کاذب: اگر روش روتین بیانگر حامل بودن جنین از نظر موتاسیون IVS II- Iباشد ولی روش تک من آن را تایید نکند، مثبت کاذب: اگر روش روتین منفی بودن موتاسیون IVS II-I را در جنین نشان دهد ولی روش تک من بیانگر حامل بودن جنین باشد. همچنین حساسیت تکنیک تک من با فرمول مثبت حقیقی/مثبت حقیقی+ منفی کاذب و اختصاصیت آن با این فرمول منفی حقیقی/منفی حقیقی+ مثبت کاذب محاسبه شد. در این مطالعه حساسیت یعنی: توانایی تکنیک تک من در شناسایی درست جنین حامل موتاسیون IVS II-I و نیز اختصاصیت یعنی: توانایی تکنیک تک من در شناسایی درست جنین بدون موتاسیون IVS II-I.

یافته‌ها

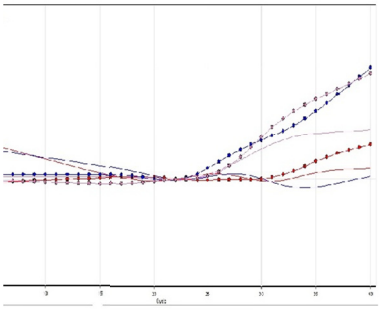
هدف از این مطالعه استفاده از روش Taq man real time PCR جهت تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی تالاسمی برای شناسایی موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین می‌باشد.

برای تعیین اختصاصیت روش تک من ریل تایم، از سه نمونه‌ی استاندارد (نرمال، هتروزیگوت و هوموزیگوت) برای موتاسیون IVS II- I استفاده کردیم. شکل ۱-A نشان‌دهنده‌ی cycling A نمونه‌های استاندارد با روش تک من real time PCR است، شکل ۱-B نمودار scatter در cycling A نمونه‌های استاندارد را با روش تک من real time PCR نشان می‌دهد. شکل ۲-A نشان‌دهنده‌ی cycling B نمونه‌های استاندارد با روش تک من real time PCR، شکل ۲-B نمودار scatter در cycling B نمونه‌های استاندارد با روش تک من real time PCR را نشان می‌دهد. همچنین الکتروفورز DNA استاندارد نیز انجام شد شکل ۲-C بیانگر اتصال درست پرایمر در جایگاه مورد نظر می‌باشد.

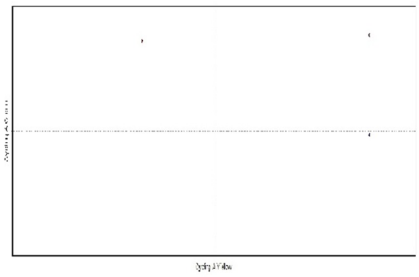
در گام بعد، حساسیت این تکنیک برای شناسایی DNA جنینی از پلاسمای مادر بررسی شد و نتایج نشان داد که این تست قادر است DNA جنین (هتروزیگوت) را با غلظت ۰/۰۱۲ نانوگرم بر میکرولیتر در مقابل DNA مادر (نرمال) شناسایی کند. همان طور که در شکل ۳- A، cycling نمونه‌های استاندار (نرمال، هتروزیگوت و هموزیگوت) با روش تک من real time PCR و شکل ۳-B نمودار scatter نمونه‌های استاندارد با روش تک من real time PCR را نشان می‌دهد.

کاربرد بالینی کاربرد بالینی تکنیک تک من در مقایسه با نتایج روش روتین ارزیابی شد. از میان ۵۰ خانم باردار، ۳۸ مورد در نمودار scatterدر مکان کنترل منفی قرار گرفتند که علت آن غلظت بسیار پایین DNA جنینی و ناکافی بودن حساسیت این تکنیک در

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

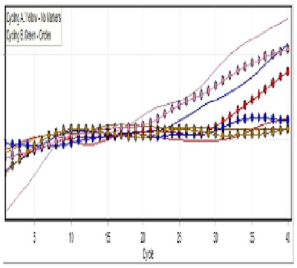


شکل 1-A

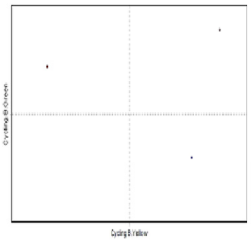


شکل 1-B

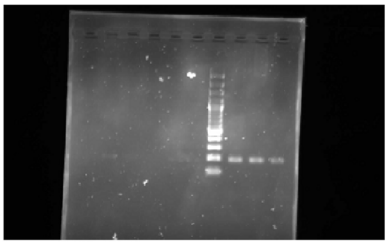
شکل ۱- تعیین اختصاصیت روش تک من ریل تایم PCR در سه نمونه استاندارد (نرمال، هتروزیگوت و هوموزیگوت)، شکل 1-A: cycling A نمونه‌های استاندارد، شکل1-B: نمودار scatter در cycling A نمونه‌های استاندارد



2-A

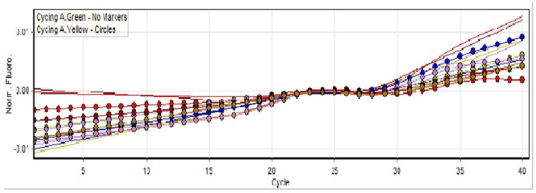


2-B

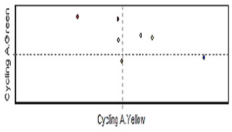


2-C

شکل ۲- 2-A : cycling B نمونه های استاندارد، شکل2-B : نمودار scatter در cycling B نمونه های استاندارد و شکل 2-C الکتروفورز محصول ریل تایمPCR



3-A



3-B

شکل ۳- ارزیابی حساسیت تکنیک تک من ریل تایم PCR. شکل 3-A: cycling A نمونه های استاندارد، شکل3-B : نمودار scatter در cycling A نمونه های استاندارد

شناسایی جهش بود. در نتیجه ارزیابی نهایی بر روی ۱۲ نمونه انجام شد. جدول ۳ بیانگر ۵ مورد مثبت حقیقی، ۴ مورد منفی حقیقی، ۲ مورد منفی کاذب و ۱ مورد مثبت کاذب است. همچنین حساسیت این روش ۷۱/۴۳٪ با فاصله اطمینان ۹۵٪ (۴۳/ ۸۳٪-۶۰٪) و اختصاصیت ۶۶/۶۷٪ با فاصله اطمینان (۷۸/۶۷٪-۵۴/۶۷٪)، نسبت احتمال مثبت ۲/۱۵، نسبت احتمال منفی ۰/۵، ارزش اخباری مثبت ۸۳/۴٪ و ارزش اخباری منفی ۶۶/۶۷٪.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

جدول ۱– کاربرد بالینی روش تک من ریل تایم در مقایسه با روش روتین

تست و نتایج	Reveres dot blot							
Taq-Man	+	_	حساسیت ٪۹۵CI	اختصاصیت ٪۹۵ CI	ارزش اخباری (٪) مثبت	ارزش اخباری منفی (٪)	نسبت احتمال مثبت	نسبت احتمال منفی
(IVS II-I)+	۵	۱	۷۱/۴۳ (٪۶۰-٪۸۳/۴)	۶۶/۶۷ (٪۵۴/۶۷-٪۷۸/۶۷)	۸۳/۴	۶۶/۶۷	۲/۱۵	۰/۵
(IVS II-I)–	۲	۴						

بحث

تولد نوزاد مبتلا به بیماری‌های ژنتیکی مانند بیماری تالاسمی پیامدهای اجتماعی، بهداشتی و فردی سنگینی دارند و انجام تشخیص قبل از تولد به‌منظور پیشگیری از تولد جنین‌های مبتلا از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. لذا، تست تشخیص قبل از تولد بایستی ترجیحاً غیرتهاجمی، قابل اطمینان و کم‌خطر برای مادر و جنین باشد. شناسایی DNA جنینی در خون مادر امکان انجام تشخیص غیرتهاجمی قبل از تولد را فراهم نموده است. در حال حاضر این روش در سه‌ماهه‌ی اول بارداری قابل انجام است البته تنها زمانی که مادر و پدر حامل جهش‌های متفاوت باشند، جهش پدری به ارث رسیده در خون مادر قابل شناسایی می‌باشد (۹). چالش اصلی در این مسیر غلظت پایین DNA جنین در برابر DNA مادر است (۲) که با روش‌های پیشرفته قابل اجرا می‌باشد (۹). کاربردهای تشخیصی دیگر (به‌غیراز تالاسمی) شامل تشخیص قبل از تولد جنسیت جنین، بیماری‌های ژنتیکی وابسته به جنس مثل هموفیلی (۱۹)، Rh جنین، انوپلوئیدی ها مثل سنروم داون، و بیماری‌های مندلی تک ژنی مثل: هموگلوبینوپاتی‌ها (۴) می‌باشد. مطالعه‌ی حاضر حساسیت روش تک من را ٪۷۱/۴۳ و اختصاصیت آن را ٪۶۶/۶۷ گزارش کرد. بدان معنی که این تکنیک قادر به شناسایی جهش پدری به ارث رسیده به جنین می‌باشد. البته مطالعات مشابه حساسیت بالای روش تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی را بررسی کردند که خلاصه‌ای از این مطالعات در جدول ۳ لیست شده است. مطالعه‌ای انجام شده توسط پراجنتاسن و همکاران، بیانگر حساسیت بسیار بالای تکنیک HRM ریل تایم PCR در تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی شده است (۲۰). چیو و همکاران نیز مطالعه‌ای بر روی ۸ زوج مینور انجام دادند که در این مطالعه نیز از متد تک من استفاده شد. آن‌ها معتقد بودند که این روش حساسیت و اختصاصت بالایی در شناسایی موتاسیون پدری به ارث رسیده به جنین دارد (۱۰). البته تفاوت نتیجه‌ی مطالعه‌ی حاضر با مطالعات مشابه در نوع کیت استخراج DNA بوده است. همچنین در این مطالعه روشی که در تشخیص قبل از تولد روتین استفاده شد Reverse dote blot بود که خود حساسیت و اختصاصیت آن ٪۸۰ و ٪۸۶ می‌باشد (۲۱). مزیت اصلی روش غیرتهاجمی قبل از تولد آسان بودن، جواب دهی سریع، عدم در معرض قرار گرفتن مادر و جنین و تحمیل عوارض ناخواسته، کم‌هزینه بودن در مقایسه با روش‌های روتین است (۲۲، ۲۳). شناسایی جهش پدری به ارث رسیده به جنین در خون مادر امکان‌پذیر است، البته به‌شرط متفاوت بودن جهش‌های پدر و مادر. در این روش اگر جهش پدری در خون مادر شناسایی نشود لزومی به انجام روش‌های روتین و تهاجمی نیست، یعنی با روش ضرورت انجام ٪۵۰ روش‌های تشخیص قبل از تولد روتین حذف می‌شود (۱۱).

نتیجه‌گیری

نتیجه‌گیری اینکه در خانم‌های باردار تالاسمی مینور که برای انجام تشخیص قبل از تولد روتین مراجعه می‌کنند، اگر موتاسیون پدری متفاوت از مادر باشد، با انجام این تکنیک می‌توان به وجود یا عدم وجود موتاسیون پدری DNA تخلیص شده پی برد که در صورت عدم وجود موتاسیون پدری جنین سالم یا مینور می‌باشد؛ لذا، نیاز به انجام روش‌های روتین و تهاجمی نیست و در صورت تایید حضور موتاسیون پدری در DNA تخلیص شده برای تایید یا رد ابتلای جنین به تالاسمی ماژور بایستی روش‌های تهاجم و روتین انجام شود و از انجایی که احتمال به ارث رسیدن آلل پدری به جنین ٪۵۰ می‌باشد با این روش می‌توان نیمی از

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

جدول ۲– مقایسه نتایج مطالعه حاضر با سایر مطالعات مشابه.

روش شناسایی جهش	استاندارد طلایی	نوع جهش	حساسیت (%)	اختصاصیت (%)	Positive predictive value	Negative predictive value	reference
Taq Man Real time PCR	sequencing	(- Codon 41/42 CTTT)	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۱	۱	(10)
Mass spectrometry	Single allele base extension reaction	CD41/42-CTTT, IVS2 654(C-T), nt-28(A-G), CD 17(A-T)	٪۶۷	٪۱۰۰	۱	۰/۷	(18)
Allele specific-Real time PCR	Peptide-Nucleic-Acid clamp		٪۱۰۰	٪۹۳/۸	۰/۹۳	۱	(12)
nested real-time allel-specific PCR	Conventional PCR	β^{17} ,$\beta^{41/42}$,β^{E}	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۱	۱	(11)
nested PCR,	ARMS	IVSI-110, codon 39, IVS I-I	٪۱۰۰	٪۹۲	۰/۹۶	۱	(17)
Microelectronic chip analysis	Direct sequencing,	IVSI-1, IVSI-6, IVS I-110 , IVS II-745	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۱	۱	(21)
AS-APEX	Reveres dot-blot hybridization	(- Codon 41/42 CTTT)	٪۷۱	٪۱۰۰	۱	۰/۳	(2)
Full Cold PCR	sequence	C39- IVS I 110	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۱	۱	(22)
Reveres dot-blot hybridization	Reveres dot-blot hybridization	IVS II 654, IVS I I, IVS I 5, ..	٪۴۰	٪۱۰۰	۱	۰/۵	(16)
DHPLC	ARMS	−28 A-G, codon 17 (A-T), IVSI-1 (G-T), IVSI-5 (G-C), codon 26 (G-A or Hb E), codons 41/42 (–TTCT), codons 71/72 (+A) and IVSII-654 (C-T)	٪۱۰۰	٪۱۰۰	۱	۱	(15)
Taq-Man-real time PCR	Reveres dot-blot hybridization	IVS II-I (G>A)	٪۷۱/۴۳	٪۶۶/۶۷	۰/۸۳	۰/۶۶	مطالعه حاضر

جنین‌های مبتلا به تالاسمی ماژور را شناسایی کرد و از انجام روش‌های تشخیص تهاجمی روتین به میزان نصف پیشگیری کرد.

محدودیت این روش در عدم توانایی تفکیک DNA مادر از جنینی در DNA تخلیص شده می‌باشد؛ لذا، تشخیص موتاسیون مادری به ارث رسیده به جنین امکان‌پذیر نمی‌باشد. در خاتمه امید است تا با استفاده از DNA جنینی شناور در پلاسمای مادر امکان تشخیص قبل از تولد غیرتهاجمی برای بیماری تالاسمی محقق گردد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان این مقاله از خانم‌های باردار شرکت کننده در این مطالعه و همه کسانیکه در نمونه‌گیری همکاری کردند تشکر و قدردانی می نماید.

کد اخلاق: IR.MAZUMS.REC.1393.926

References

1. Modell B, Khan M, Darlison M, Westwood MA, Ingram D, Pennell DJ. Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T2* cardiovascular magnetic resonance. J Cardiovasc

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]

Magnet Resonance. 2008;10(1):1-8.
2. Chan K, Yam I, Leung K, Tang M, Chan T, Chan V. Detection of paternal alleles in maternal plasma for non-invasive prenatal diagnosis of β-thalassemia: A feasibility study in southern Chinese. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2010;150(1):28-33.
3. Tong Y-K, Lo YD. Diagnostic developments involving cell-free (circulating) nucleic acids. Clin Chim Acta. 2006;363(1-2):187-96.
4. Phylipsen M, Yamsri S, Treffers EE, Jansen DT, Kanhai WA, Boon EM, et al. Non-invasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia and sickle-cell disease using pyrophosphorolysis-activated polymerization and melting curve analysis. Prenat Diagnos. 2012;32(6):578-87.
5. Wright CF, Wei Y, Higgins JP, Sagoo GS. Non-invasive prenatal diagnostic test accuracy for fetal sex using cell-free DNA a review and meta-analysis. BMC Res Notes. 2012;5(1):1-11.
6. Hill M, Barrett AN, White H, Chitty LS. Uses of cell free fetal DNA in maternal circulation. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2012;26(5):639-54.
7. Alberry MS, Soothill PW. Non-invasive prenatal diagnosis: implications for antenatal diagnosis and management of high-risk pregnancies. Seminars in Fetal & Neonatal Medicine. 2008;13(2):84-90.
8. Gibson NJ. The use of real-time PCR methods in DNA sequence variation analysis. Clin Chim Acta. 2006;363(1-2):32-47.
9. Yenilmez ED, Tuli A, Evrüke İC. Noninvasive prenatal diagnosis experience in the Çukurova Region of Southern Turkey: detecting paternal mutations of sickle cell anemia and β-thalassemia in cell-free fetal DNA using high-resolution melting analysis. Prenat Diagnos. 2013;33(11):1054-62.
10. Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chow KC, Chui DH, Lo YD. Prenatal exclusion of β thalassaemia major by examination of maternal plasma. Lancet. 2002;360(9338):998-1000.
11. Tungwiwat W, Fucharoen G, Fucharoen S, Ratanasiri T, Sanchaisuriya K, Sae-Ung N. Application of maternal plasma DNA analysis for noninvasive prenatal diagnosis of Hb E-β-thalassemia. Translat Res. 2007;150(5):319-25.
12. Er TK, Lin SF, Chang JG, Hsieh LL, Lin SK, Wang LH, et al. Detection of the JAK2 V617F missense mutation by high resolution melting analysis and its validation. Clin Chim Acta. 2009;408(1-2):39-44.
13. company Q. Type-it Fast SNP Probe PCR Handbook: QIAGEN company; 2011 [For 5'-nuclease probe-based SNP detection with reliably high call rates]. Available from: https://www.qiagen.com/be/resources/resourcedetail?id=3832172a-29c8-4108-8e58-84a610c91c7e&lang=en.
14. Gill P, Forouzandeh M, Eshraghi N, Ghalami M, Safa M, Noori-Daloii M-R. Detection of four β-thalassemia point mutations in Iranians using a PCR-ELISA genotyping system. Mol Cell Probes. 2008;22(2):103-9.
15. Prajantasen T, Fucharoen S, Fucharoen G, Siriratmanawong N, Pinmuang-Ngam C. Prenatal and post-natal screening of β-thalassemia and hemoglobin E genes in Thailand using denaturing high performance liquid chromatography. Mol Biol Rep. 2013;40(4):3173-9.
16. Li G, Rong K, Luo Y, Chen D, Gong C, Wu J, et al. Prenatal diagnosis of β-thalassaemia using cell-free fetal DNA in maternal plasma. J South Med Univ. 2011;31(8):1437-9.
17. Lazaros L, Hatzi E, Bouba I, Makrydimas G, Dalkalitsis N, Stefos T, et al. Non-invasive first-trimester detection of paternal beta-globin gene mutations and polymorphisms as predictors of thalassemia risk at chorionic villous sampling. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2008;140(1):17-20.
18. Ding C, Chiu RW, Lau TK, Leung TN, Chan LC, Chan AY, et al. MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: application to noninvasive prenatal diagnosis. Proceed Natl Acad Sci. 2004;101(29):10762-7.
19. Tsui NB, Kadir RA, Chan K, Chi C, Mellars G, Tuddenham EG, et al. Noninvasive prenatal diagnosis of hemophilia by microfluidics digital PCR analysis of maternal plasma DNA. Blood. 2011;117(13):3684-91.
20. Prajantasen T, Fucharoen S, Fucharoen G. High resolution melting analytical platform for rapid prenatal and postnatal diagnosis of β-thalassemia common among Southeast Asian population. Clin Chim Acta. 2015;441:56-62.
21. Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Bocchino ML, Ponticiello A, Barra E, et al. Lung cancer metastatic cells detected in blood by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and dot-blot analysis. J Clin Oncol. 1997;15(11):3388-93.
22. Lin M, Jiao J-W, Zhan X-H, Zhan X-F, Pan M-C, Wang J-L, et al. High resolution melting analysis: a rapid screening and typing tool for common β-thalassemia mutation in Chinese population. PLoS One. 2014;9(8):e102243.
23. Shih H-C, Er T-K, Chang T-J, Chang Y-S, Liu T-C, Chang J-G. Rapid identification of HBB gene mutations by high-resolution melting analysis. Clin Biochem. 2009;42(16-17):1667-76.

[Downloaded from rjms.iums.ac.ir on 2026-01-28]